

好熱細菌および海洋細菌のカロテノイドに関する化学的研究

著者	横山 昭裕
号	541
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/16395

氏 名(本籍) よこ横 やま山 あき昭 ひろ裕

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 5 4 1 号

学位授与年月日 平 成 8 年 1 月 11 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 好熱細菌および海洋細菌のカロテノイド
に関する化学的研究

論文審査委員(主 査) 教 授 安 元 健

教 授 藤 本 健四郎

教 授 秦 正 弘

論文内容要旨

序論

生体色素群の1つであるカロテノイドは、主として黄色～赤色を示すC₄₀のテトラテルペンであり、微生物、植物、動物界に広く分布する。微生物と植物は生合成能を有するが、動物はその能力を有しないために食物より摂取し、代謝・蓄積している。最近、抗酸化作用、免疫増強作用、抗ガン、抗発ガンなどの作用が見いだされ、生理学・栄養学的な意味からも、カロテノイドが注目を集めている。近年の分離・分析技術の発達に伴い、これまで600種を越えるカロテノイドが動物、植物、微生物から単離・構造決定されており、細菌のカロテノイドについても、多くの研究がなされている。しかし温泉に分布する高度好熱菌や海洋細菌のような特殊な環境に生育する細菌については、土壌細菌などの一般細菌と比較して微生物学研究は遅れており、同時にそれらの生産するカロテノイドについても未解明な成分が存在する。

これらのことを踏まえ、本研究では、好熱細菌および海洋細菌を対象試料として、新規カロテノイドの化学構造解析、および有用カロテノイド生産株の探索を中心として、以下の項目について解明を行った。

1. 高度好熱細菌 *Thermus thermophilus* の生産する主カロテノイド成分として新規カロテノイド配糖体脂肪酸エステル3種を単離し、化学構造を解明した。
2. 広く海洋細菌を採取し、*Flavobacterium* sp. P99-3株の生産する橙色カロテノイドを単離し、化学構造を解明した。
3. 有用カロテノイドastaxanthinの生産細菌を探索し、*Agrobacterium aurantiacum* がastaxanthinを生産することを確認した。
4. Astaxanthin生産細菌 *A. aurantiacum* より、astaxanthinとその前駆体10種のカロテノイドを検出・同定し、生合成経路を推定した。
5. 3種の海洋細菌の生産する高極性カロテノイドについて検討し、6種の新規カロテノイド配糖体、トリヒドロキシ体、硫酸エステル体の化学構造を解明した。

第1章 高度好熱菌の生産する新規カロテノイド配糖体脂肪酸エステル類

高度好熱性真正細菌 *Thermus* 属は、黄色カロテノイドを生産することが知られているが、その化学構造は未解明であった。そこでカロテノイド過剰生産株 *T. thermophilus* Cop101 (pCOP1) を大量培養して、カロテノイドを抽出・精製し、**1a-c**, **2a-c**, **3a-c** の9種の成分を単離した。

化合物**1a**の1D ^1H NMR (Fig. 1) は、カロテノイド、糖および脂肪酸に特徴的なシグナルを示した。カロテノイド部分は(3*R*, 3'*R*)-3-substituted-zeaxanthin、糖部分は6-*O*-acyl- β -D-glucoseと同定された。脂肪酸部分は末端の2つのダブルットメチルおよびメタノリシス生成物の標品とのGC-MSによる比較によって11-methyldodecanoate (iC13) と同定された。さらに、NOESYとHMBCの結果と合わせて、**1a**を新規カロテノイド配糖体エステル thermozeaxanthin-13 (zeaxanthin- β -D-glucoside-iC13 ester) と決定した (Fig. 2)。同様に主として**1a**のデータとの比較によって、thermozeaxanthin-15 (**1b**) および同-17 (**1c**) を決定した。化合物**2a-c**の1D ^1H NMRでは、カロテノイド1分子に対してグルコースおよび分岐飽和脂肪酸各2分子が観測された。 ^1H NMRによる**1a**との比較、HRFABMSおよびGC-MSの結果より、thermobiszeaxanthin-13-13 (**2a**)、同-13-15 (**2b**)、同-15-15 (**2c**)の構成を有する zeaxanthin- β -diglucosideのbis-fatty acidエステルと決定した (Fig. 2)。 ^1H NMRにおいて**3a-c**は、カロテノイド部分の一方のend groupのみが**1a**と異なっており、3-substituted- β -cryptoxanthinと帰属され、最終的にはthermocryptoxanthin-11 (**3a**)、同-13 (**3b**) および同-15 (**3c**) を β -cryptoxanthin-monoglucosideのiC11、iC13およびiC15エステル体と決定した (Fig. 2)。

細菌におけるカロテノイドの役割の一つに、 C_{40} の分子長が脂質二重層の厚さに丁度一致し、脂質二重層を縦型に貫通して補強していることが報告されている。本菌株の生産するカロテノイド配糖体エステルは、疎水-親水-疎水性の特異な構造を有することから、Fig. 3に示すように脂質二重層を「カギ型」に貫通し、高温における細胞膜の安定化に寄与する要素の一つとなっていると推定した。

第2章 海洋細菌の生産するモノサイクリックカロテノイドmyxol

日本沿岸およびヤップ、パラオの南太平洋海域の海水、底泥、カイメン等の無脊椎動物から、海洋細菌約2,000株を分離した。その中で橙～赤色を示すコロニー約50株について液体培養を行い、TLCによりカロテノイドの分布を調べた。パラオ産カイメン *Homaxinella* sp.より分離した *Flavobacterium* sp. P99-3株について、大量培養後、抽出・精製し、橙色の主成分4を得た。各種機器分析の結果、4をモノサイクリックカロテノイド myxol と同定された (Fig. 4)。Myxolは、ラン藻の生産する myxoxanthophyll (myxol 2'-O-rhamnoside) のアグリコンとして知られているが、今回天然物として初めて単離された。

第3章 海洋細菌の生産する有用カロテノイドastaxanthinおよびadonixanthin

Astaxanthinはエビ、カニ、マダイ、サケなどの海洋生物に広く分布する赤色カロテノイドとして知られており、養殖魚介類の色揚げ剤として有用である。本章では、海洋細菌に着目しastaxanthin生産能を有する細菌の探索を行った。

前章で述べた海洋細菌カロテノイドのTLC分析による探索において、沖縄県慶良間列島海水より分離され *Agrobacterium aurantiacum* と同定された株の生産するカロテノイドのR_f値が、astaxanthin標品と一致することを見出した。そこで大量培養後、抽出・精製し、5および6を得た。VIS, ¹H NMR, EIMS, CD, 光学分割HPLC分析の結果、5 (Fig. 5) は、(3S, 3'S)-astaxanthin、化合物6は(3S, 3'R)-adonixanthinのデータと完全に一致した。

現在、astaxanthinの供給源としては有機合成品のほか天然物由来のものとしてナンキョクオキアミ、緑藻 *Haematococcus*、酵母 *Phaffia* などの実用化が検討されている。今回、細菌による生産を初めて確認した。今後培養条件の最適化や過剰生産変異株の取得を図ることにより、産業上の応用が期待できる。

第4章 Astaxanthin生産海洋細菌におけるastaxanthin生合成経路の推定

前章で述べたastaxanthin生産細菌 *A. aurantiacum* は、astaxanthinのほか、その前駆体と考えられるadonixanthinも生産する。このことは、他のastaxanthin生産微生物(緑藻や酵母、Fig. 6)では見られない現象であるので、astaxanthin生成に至る生合成経路に興味を持たれた。また、工業生産のための基礎データを得る上でも重要であるので、前駆体の化学分析による生合成経路、特にカロテンの酸化経路の解明を試みた。

A. aurantiacum を培養液と空気との接触面積の異なる3種の条件 (Fig. 7) で培養し、ODS-HPLCによって抽出液を分析した。さらにVIS、EIMS、1D ^1H NMR、CDにより各成分を同定した (Fig. 8)。その結果、astaxanthin、adonixanthin以外に推定前駆体と考えられる8種のカロテノイド β -carotene、echinenone、 β -cryptoxanthin、3-hydroxyechinenone、canthaxanthin、3'-hydroxyechinenone、zeaxanthin、adonirubinを検出・同定した。このことより *A. aurantiacum* は、 β -carotene合成後、3位、3'位の2回の水酸化および4位、4'位のメチレン基のケト基への2回の酸化を経てastaxanthinを合成する新規生合成系を有すると推定された。その反応順序は培養条件によりコントロールされ则认为られた (Fig. 9)。

第5章 海洋細菌の生産する新規高極性カロテノイド類

(1) 上述の *A. aurantiacum* の高極性画分に新たなカロテノイドが確認されたので、大量培養後、抽出・精製し、2つの高極性成分(7および8)を単離した。HRFABMSにより7は、astaxanthinのヘキソース誘導体と推定された。各種NMR、astaxanthinとのCDによる比較により、7のカロテノイド部分を(3*S*, 3'*S*)-3-substituted-astaxanthinと同定した。また、糖部分はケミカルシフト、結合定数より β -D-glucoseと同定した。NOESYの相関の結果を合わせ新規カロテノイド配糖体(3*S*, 3'*S*)-astaxanthin- β -D-glucoside (7)を構造決定した (Fig. 10)。同様に8を新規カロテノイド配糖体(3*S*, 3'*R*)-adonixanthin- β -D-glucosideと決定した。

(2) 硫黄島海域海水より分離したSD-212株 (*Pseudomonas* と仮同定) について、大量培養・抽出・精製を行い、5つの高極性成分(9-13)を単離した。VIS, HREIMS, NMR, CDによって、2種の新規トリヒドロキシケトカロテノイド、(2*R*, 3*S*, 3'*S*)-2-hydroxyastaxanthin (9) と(2*R*, 3*S*, 3'*R*)-2-hydroxyadonixanthin (10)を構造決定した (Fig. 11)。また、astaxanthin およびadonixanthinの生産を確認したほか、erythroxanthin (11)、そして2種のテトラヒドロキシ体 (12および13)を同定した (Fig. 11)。

(3) パラオ海域海水より分離したPC-6株 (*Flavobacterium* と仮同定) について、大量培養・抽出・精製を行い、4つの高極性成分(13-16)を単離した。化合物14は、HRFABMSによって2,3,2', 3'-tetrahydroxy- β , β -caroten-4-one(13)のモノ硫酸エステル体と分子量が一致し、各種機器分析によって、新規カロテノイド硫酸エステル、(2*R*, 3*S*, 2'*R*, 3'*R*)-4-ketonostoxanthin 3'-sulphateと構造決定した (Fig. 12)。同様に15を新規カロテノイド硫酸エステル、(2*R*, 3*R*, 2'*R*, 3'*R*)-nostoxanthin 3-sulphateと構造決定した (Fig. 12)。

(4) 3種の海洋細菌より単離・構造決定され、6種の新規高極性カロテノイド類は、astaxanthinやadonixanthinなどから誘導されたものであり、生合成、特に最終生産物が株によって異なる点で非常に興味深い。また、astaxanthinと同一基本骨格を有する親水性の高い化合物であることから生物活性の面でも興味を持たれる。

総括

1. 高度好熱性細菌 *Thermus thermophilus* の主カロテノイド成分を単離し、新規カロテノイド配糖体脂肪酸エステルthermozeaxanthin類、thermobiszeaxanthin類、thermocryptoxanthin類の構造を決定した。本カロテノイド類は、細胞膜の脂質二重層をカギ型に貫通し高温における細胞膜の安定化に寄与していると考えられる。

2. 日本沿岸および南太平洋海域より2,000株の海洋細菌を分離した。パラオ産カイメン *Homaxinella* sp.より分離した *Flabovacterium* sp. P99-3株の生産する橙色カロテノイドを単離し、構造解析の結果、天然物として初めてmyxolを同定した。

3. 沖縄海域海水より分離された *Agrobacterium aurantiacum* の生産するカロテノイドについて、大量培養後精製し、各種機器分析によりastaxanthinおよび主成分として adonixanthinを同定した。Astaxanthin生産微生物としては、緑藻や酵母が知られているが、今回初めて細菌による生産を確認した。

4. Astaxanthin生産細菌 *A. aurantiacum* の生産するカロテノイドについて、各種機器分析により、astaxanthin, adonixanthinのほか、その前駆体と推定される8種のカロテノイドを検出・同定した。*A. aurantiacum* は、 β -carotene合成後、3位、3'位の2回の水酸化および4位、4'位の2回のメチレン基のケト基への酸化を経てastaxanthinを生成する新規生合成系を有すると推定された。

5. 海洋細菌 *A. aurantiacum* より2種の新規カロテノイド配糖体を単離・構造決定した。また、海洋細菌SD-212株より2種の新規ヒドロキシカロテノイドを構造決定した。さらに、海洋細菌PC-6株より2種の新規カロテノイド硫酸エステルを構造決定した。これら、カロテノイド類はastaxanthinやadonixanthinなどから誘導されたものであり、生合成や、生理的役割の面で非常に興味深い。また、astaxanthinと基本骨格が同一ありながら、親水性が高くなった化合物であり、生物活性の面においても興味を持たれる。

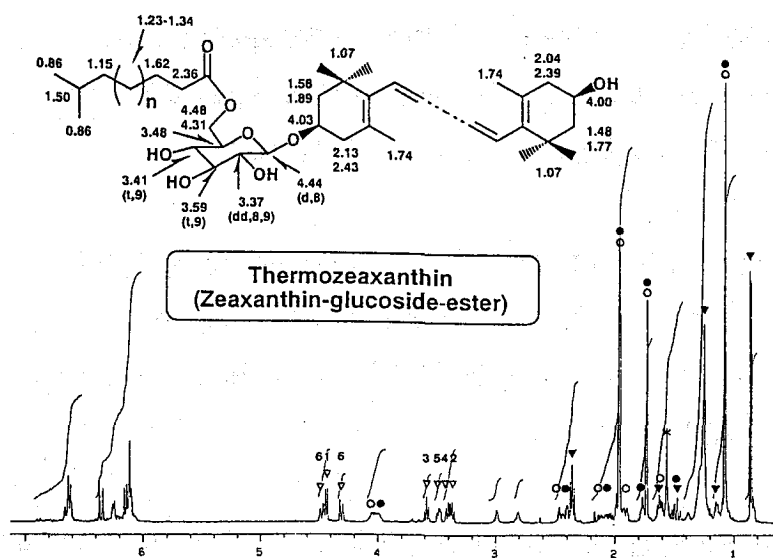


Fig. 1. ^1H -NMR data of thermozeaxanthins (1). (CDCl_3 , 500MHz)

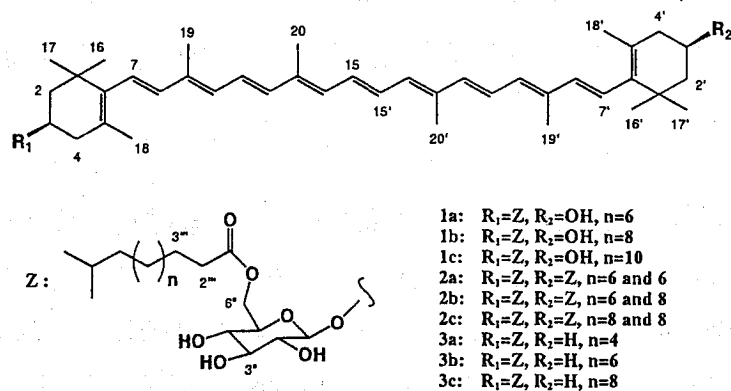


Fig. 2. Structures of new carotenoids 1a-3c.

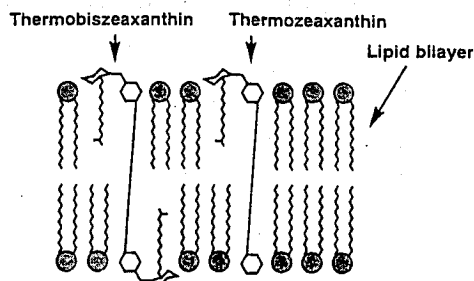


Fig. 3. Probable mechanism for the membrane stabilization by carotenoid-glucoside-esters.

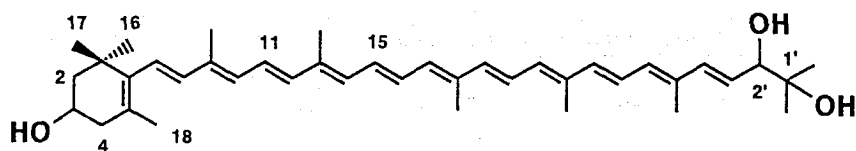


Fig. 4. Structure of myxol (4).

UV-VIS : λ_{\max} 486nm(Bz)

EI-MS : m/z 596(M^+), 580(M^+-16)

CD : 363(+5.2), 313(-24.5), 272(+14.0), 242(-15.5)

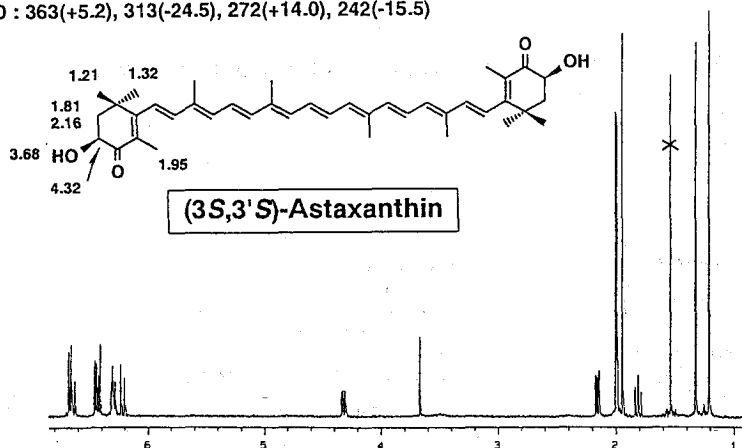


Fig. 5. Spectral data of bacterial astaxanthin (5).

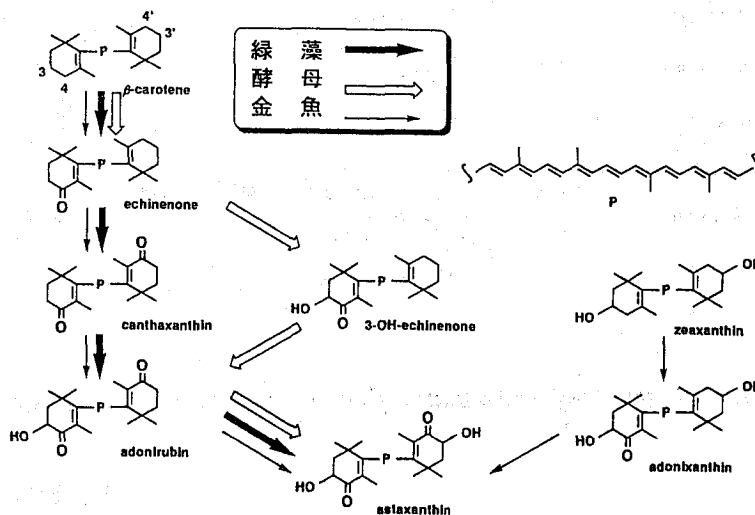


Fig. 6. Biosynthetic pathways for astaxanthin in green algae, yeast, and goldfishes.

Culture Conditions (20°C, 4days)

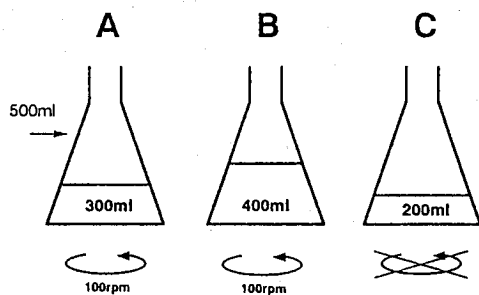


Fig. 7. Different culture conditions for *A. aurantiacum*.

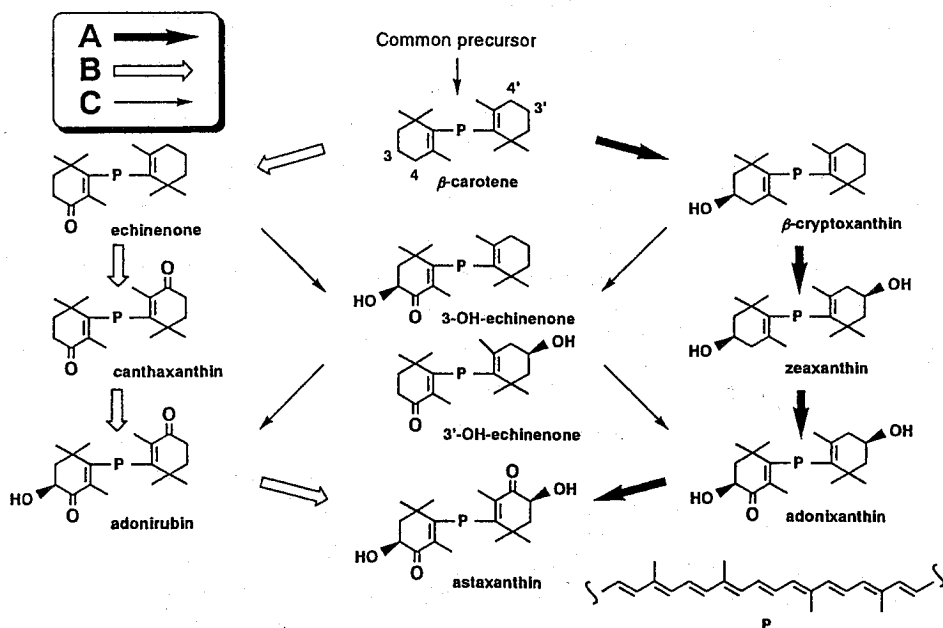
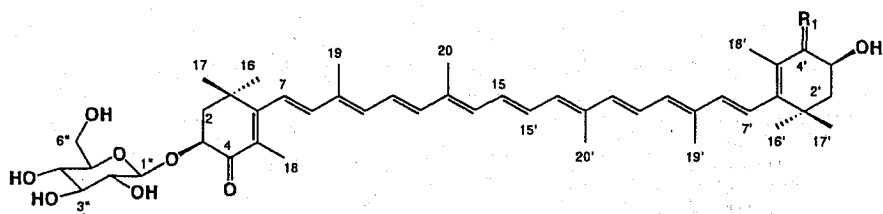


Fig. 9. Probable biosynthetic pathway for astaxanthin in *A. aurantiacum*.

(Fig. 8は次ページ)



(3*S*,3'*S*)-Astaxanthin- β -D-glucoside (7) : R₁=O
 (3*S*,3'*R*)-Adonixanthin- β -D-glucoside (8) : R₁=H₂

Fig. 10. Structures of new carotenoids 7 and 8.

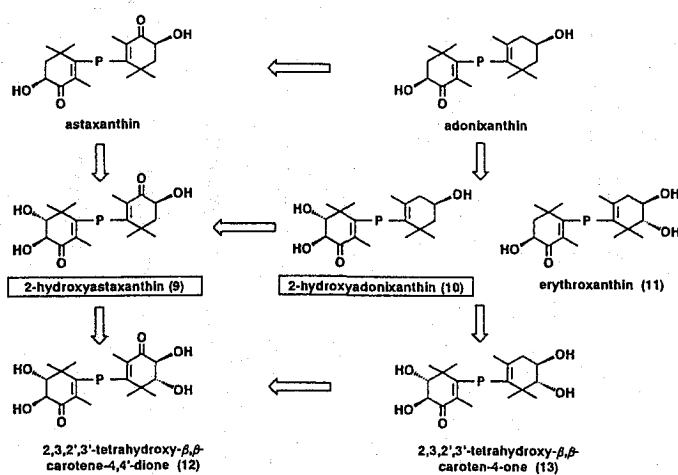
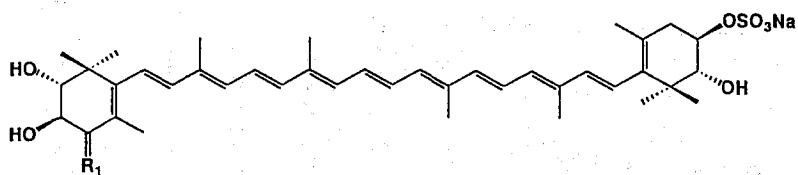


Fig. 11. Structures and probable biosynthetic route of 9-13.



(2*R*,3*S*,2'*R*,3'*R*)-4-Ketonostoxanthin 3'-sulphate (14) : R₁=O
 (2*R*,3*R*,2'*R*,3'*R*)-Nostoxanthin 3'-sulphate (15) : R₁=H₂

Fig. 12. Structures of new carotenoids 14 and 15.

論文審査の要旨

カロテノイドは微生物、植物、動物に広く分布する生体色素群である。動物は生合成能を有しないので食物より摂取し、代謝・蓄積する。ビタミンAの前駆体としての役割に加えて、近年は抗酸化作用、免疫増強作用、抗がん作用、抗発がん作用等の多様な機能が明らかにされつつある。また、動物の体色改善や食品の着色等の産業的用途も広い。本研究は高熱の温泉や海洋等の特殊環境下に生息する細菌のカロテノイド色素の化学構造と生合成経路を明らかにすることを目的として行われた。

最初に高度好熱細菌 Thermus thermophilus の主カロテノイドについて検討し、新規カロテノイド配糖体脂肪酸エステルとして thermozeaxanthin 類, thermobiszeaxanthin 類, thermocryptoxanthin 類の化学構造を決定した。また、その構造上の特性に基づいて、本カロテノイド類が細胞膜の脂質二重層をカギ型に貫通し、高温における膜の安定化に寄与していると推定した。

海洋細菌としては、まず、Flavobacterium sp. P993 株から myxol を単体としては初めて単離した。次いで、Agrobacterium aurantiacum 及び海洋細菌 SD-212 株から astaxanthin 及び adonixanthin を同定した。Astaxanthin は養殖魚介類の体色改善剤として産業的に重要であり、緑藻や赤色酵母による生産が知られていたが、細菌による生産の確認は今回が初めてである。さらに、A. aurantiacum からは 8 種の astaxanthin 及び adonixanthin 前駆体を検出・同定し、 β -carotene の 3 位, 3' 位への水酸基導入、及び 4 位, 4' 位のケト基への酸化を経る astaxanthin の新規生合成経路を解明した。この知見に基づいて、astaxanthin 生合成系遺伝子 crtW が初めて特定され、本遺伝子によってコードされた酸化酵素により、 β -carotene や zeaxanthin から canthaxanthin や astaxanthin が生合成されることが明らかにされた。さらに、糖や水酸基、ケト基を有する新規カロテノイド類を単離・構造決定し、水溶性色素としての産業的重要性を指摘した。

以上のように、本論文は特殊環境細菌のカロテノイドの単離・構造決定を介して、新規生合成経路の発見と遺伝子の特定を行い、さらに産業的応用をも展望した重要な成果を含んでいる。よって、博士（農学）の学位を授与するに値すると判定された。